Einfluss von Mineralsalzmangel auf die Chlorophyllbildung und das Verhältnis der Chlorophylle a und b in Grünalgen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Peter Schürmann
aus Luzern

1966

Büchler + Co AG Wabern - 1966

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. *M. Geiger-Huber*
Dr. *H. Zoller*

Basel, den 8. Februar 1966

Prof. Dr. *W. Habicht*, Dekan

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Separatabdruck aus «Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft»
1966, Band 76
(Als Sonderdruck erschienen am 4. August 1966)

Einfluss von Mineralsalzmangel auf die Chlorophyllbildung und das Verhältnis der Chlorophylle a und b in Grünalgen

Von *Peter Schürmann*

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel)

Manuskript eingegangen am 5. Februar 1966

Einleitung 59
Methode 60
Versuchsobjekt 60
Nährlösung 61
Algenaufzucht 62
Ausführung der Versuche 63
Aufarbeiten des Versuchsmaterials 64
Bezugsgrössen 70
Statistische Auswertung 70
Versuche 70
Eisenmangel 70
Stickstoffmangel 78
Magnesiummangel 84
Diskussion 89
Zusammenfassung 93
Literaturverzeichnis 94

Einleitung

Seit Stokes (1864) mitteilte, dass in der Pflanzenzelle verschiedene, chemisch sehr ähnliche Chlorophylle (Chlorophylle a, b, c) zusammen mit anderen Pigmenten vorhanden sind, interessierte es die Forscher, welche Aufgaben den verschiedenen Farbstoffen zukommen. Um diese Frage klären zu können, mussten zuerst die quantitativen Beziehungen zwischen den Chloroplastenpigmenten bekannt sein. Ein erstes Ergebnis in dieser Richtung stammt von Sorby (1873), wonach der Anteil der beiden

Chlorophylle a und b mit den Species und mit ökologischen Bedingungen variiere.

In weiteren Arbeiten wurden von verschiedenen Autoren die Einflüsse von Umweltsbedingungen (Strott, 1938), vor allem der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung des der Pflanze zur Verfügung stehenden Lichtes, auf die Ausbildung der Chloroplastenfarbstoffe und auf deren Verhältniszahlen untersucht (Egle, 1937, Seybold und Egle, 1937, 1938, Seybold, 1942, Strott, 1938). Dabei wurde festgestellt, dass die Ausbildung in starkem Masse genetisch fixiert ist, dass aber eine Veränderung der Verhältniszahlen in geringem Masse durch Umweltsfaktoren möglich ist.

In neuerer Zeit bestätigten sich auch die Vermutungen, dass selbst innerhalb eines Tages das Komponentenverhältnis bei höheren Pflanzen sich ändert (Ziegler und Egle, 1965 b, dort weitere Literatur).

Noch ungenügend untersucht ist die Abhängigkeit des Komponentenverhältnisses von äusseren Faktoren wie der mineralischen Ernährung. In verschiedenen Arbeiten über die mineralische Ernährung ist die Frage der Pigmentausbildung zwar behandelt worden, aber ein Einfluss auf das Komponentenverhältnis wurde dabei nicht berücksichtigt.

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob das Komponentenverhältnis Chlorophyll a/b bei den gewählten Untersuchungsobjekten konstant ist oder ob es sich durch Änderungen in der mineralischen Ernährung verschieben lässt.

Methode

Versuchsobjekt

Zum Objekt meiner Untersuchungen wählte ich keine höhere Pflanze, sondern einzellige Grünalgen.

In den Versuchen sollte der Einfluss der mineralischen Ernährung auf die Pigmente des photosynthetischen Apparates untersucht werden. Dazu müssen ganz bestimmte Umweltsfaktoren für alle photosynthetisch aktiven Zellen verändert werden. Eine Algenkultur hat gegenüber einer höheren Pflanze mit Organen verschiedener Funktion den Vorteil, dass sie nur aus photosynthetisch aktiven Zellen besteht und diese sich relativ leicht unter definierten Bedingungen halten lassen. Die Versuche können kurzzeitig und in statistisch sauber auswertbarer Art angesetzt werden.

Die verwendeten Algenstämme finden sich in der Sammlung des Botanischen Institutes der Universität Basel. Ich wählte diejenigen einzelligen

Algen *(Chlorophyceae, Protococcales)* aus, die sich in Flüssigkeitskulturen am besten (rasche Zellvermehrung, praktisch keine toten Zellen, kaum Schaumbildung) züchten liessen. Es waren dies:

Nr. 164: *Dictyococcus engadinensis* (Kol et F. Chod.) Vischer, 1936, Bodenalge, isoliert aus einer Bodenprobe aus 2060 m Höhe aus dem Schweizerischen Nationalpark (Kol und Chodat, 1934)

Nr. 108: *Muriella aurantiaca* Vischer, gefunden auf frischer Lehmerde und an einer weiss gekalkten Hausmauer in Schmieheim im Schwarzwald (Vischer, 1936)

In autotrophen Vorversuchen mit *Dictyococcus* und *Muriella* zeigte es sich, dass beide Organismen auf die untersuchten Bedingungen gleichsinnig reagieren. *Muriella* aber eignete sich besser für die autotrophe Anzucht, weshalb ich dann für die autotrophen Hauptversuche ausschliesslich diese Alge verwendete.

Nährlösung

Verschiedene Nährlösungen wurden auf ihre Eignung für die Aufzucht von Algen aus der Sammlung des Institutes geprüft:

Knop+A–Z nach Hoagland
Nährlösung nach H. v. Witsch (1958)
Nährlösung nach Pirson et al. (1952)
Nährlösung nach Myers und Clark (1944)

Am besten bewährt für die Aufzucht der genannten Algen hat sich die Nährlösung nach Myers und Clark (1944) mit dem Spurenelementzusatz nach Myers (1950): KNO_3 1,25 g, KH_2PO_4 1,25 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,00 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 30 ppm, H_3BO_3 20 ppm, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 ppm, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 20 ppm, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 4 ppm, MoO_3 4 ppm, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 4 ppm, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 1 ppm, EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure) 0,5 g in 1 l entsalztem Wasser.

Für sämtliche Versuche wurde diese Nährlösung verwendet. Bei mixotropher Anzucht kamen zu den anorganischen Salzen noch 0,5 % Glukose als C-Quelle hinzu.

Der Anfangs-pH-Wert war mit KOH auf 6,2 eingestellt. Die Nährlösungen wurden eine halbe Stunde bei 1 atü im Autoklav sterilisiert. Es bildete sich dabei manchmal ein schwacher Niederschlag, der sich aber beim Schütteln der Nährlösung wieder auflöste.

Die verwendeten Substanzen waren analysenrein, ausser Glukose. Das Wasser wurde in einem Ionenaustauscher entsalzt und hatte einen spezifischen Widerstand von rund 2 Millionen Ohm.

Die Stammkulturen der Versuchsalgen wurden in Schrägagarröhrchen ($\frac{1}{3}$ Knop) gezogen. Von den Stammkulturen wurden mixotrophe Flüssigkeitskulturen geimpft. Sobald sich die Algen in den Flüssigkeitskulturen genügend vermehrt hatten, konnten damit Vorkulturen oder Versuche beimpft werden.

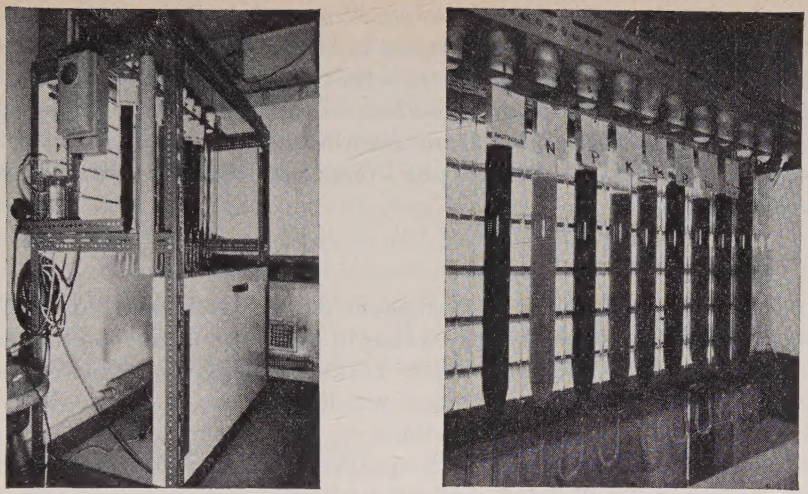
Mixotrophe Algenaufzucht

Versuche unter mixotrophen Bedingungen wurden steril angesetzt, da durch die Gegenwart von Glukose die Infektionsgefahr wesentlich erhöht ist. Als Kulturgefässe benutzte ich Fernbachkolben, in denen sich je 100 cm^3 Nährlösung befanden. Fernbachkolben haben den Vorteil, dass die Flüssigkeitsoberfläche gross ist und die Schichtdicke gering (ca. 1 cm), was genügenden Lichtgenuss und gute Durchlüftung garantiert. Die Kolben wurden in Schüttelkörben mit temperaturkonstantem Wasserbad (s. Schaub, 1958, Fig. 2) während der ganzen Versuchsdauer geschüttelt. Die Temperatur betrug für alle Hauptversuche 25 °C. Die Kulturen wurden von oben mit Fluoreszenzlampen (Philips TL 34) während 14 Stunden beleuchtet. Die Lichtstärke betrug auf der Höhe der Kulturen ungefähr 4500 Lux.

Autotrophe Algenaufzucht

Die Fernbachkolben erwiesen sich für eine autotrophe Kultur der Algen als ungeeignet. Es wurde deshalb eine spezielle Apparatur gebaut, mit der grössere Algenmengen für die verschiedensten Zwecke gezüchtet werden können (Fig. 1). Die Kulturgefässe waren 70 cm hohe Zylinder aus Pyrexglas mit einem Durchmesser von 5 cm, die unten konisch in einer Düse von 0,5 bis 1 mm Durchmesser endigten (v. Witsch, 1958). Die Zylinder enthielten je 900 cm^3 Nährlösung, welche durch die Düsen mit einem CO_2-Luft-Gemisch (5 % CO_2) aus Gasflaschen ständig belüftet wurden. Vor dem Einleiten in die Kulturzylinder wurde das Gemisch in einer Waschflasche befeuchtet und durch einen Wattefilter von etwa vorhandenen Staubpartikeln befreit. Für eine homogene Kultur war eine ziemlich rasche Blasenfolge nötig. Die daraus resultierende Bewegung der Kulturlösung garantierte einen gleichmässigen Lichtgenuss der Algen.

Zwölf Kulturzylinder waren in einer Reihe nebeneinander angeordnet und von zwei gegenüberliegenden Seiten mit Fluoreszenzröhren (je 6 Philips TL 34, 40 Watt) beleuchtet. Im Abstand der Kulturen betrug die Lichtintensität ca. 15000 Lux. Diese hohe Lichtintensität hemmte das Wachstum sehr dünner Suspensionen. Deshalb wurde nach dem Beimpfen eines Versuches je nach Suspensionsdichte während eines oder



Figur 1

Apparatur für die autotrophe Aufzucht von grösseren Algenmengen

Links: Die zylindrischen Kulturgefässe stehen senkrecht, in der Mitte zwischen den beiden Flächenleuchten. Die vordere Flächenleuchte ist hinuntergeschoben

Rechts: Detailansicht der Kulturröhren

mehrerer Tage mit geringerer Intensität (10000 Lux) belichtet. Die Belichtungsdauer war für alle Versuche auf 16 Stunden pro Tag festgesetzt.

Die Apparatur befand sich in einem Raum, den man ziemlich temperaturkonstant halten konnte. Die Versuchstemperatur betrug 25 $\pm$ 1 °C.

Ein streng steriles Arbeiten war bei der autotrophen Aufzucht nicht mehr nötig. Die Algen entwickelten sich sehr rasch und kräftig. Bakterien konnten in allen Versuchen, ausser bei starkem Mg-Mangel, nur in sehr kleiner Zahl gefunden werden (vgl. Ruschmann, 1956). Die Nährlösungen wurden dennoch immer sterilisiert und die Kulturgefässe nach gründlicher mechanischer Reinigung mit verdünntem Alkohol (ca. 40%ig) ausgespült.

Ausführung der Versuche

Impfen

Um die Versuchszeit kurz zu halten und dennoch genügend Algen für genaue Chlorophyllanalysen zu haben, wird relativ viel Algenmaterial geimpft. Die Vorkulturen werden abzentrifugiert, zweimal mit entsalztem

Wasser gewaschen und in entsalztem Wasser suspendiert. Da bei der Zentrifugation Zellklumpen entstehen können, die Impfsuspension aber so homogen wie möglich sein soll, wird sie vor dem Impfen für kurze Zeit geschüttelt. Bei mixotrophen Versuchen werden 2 bis 5 cm^3 Impfsuspension pro Versuchskolben mit 100 cm^3 Nährlösung geimpft, bei autotrophen 20 oder 25 cm^3 Impfsuspension pro Versuchskolben mit 900 cm^3 Nährlösung.

Vorkultur

Deutliche Mangelchlorosen, verursacht durch das Fehlen von Magnesium oder von Spurenelementen, traten in kürzeren Versuchen nur dann auf, wenn die Algen bereits in einer Vorkultur einige Tage ohne das zu untersuchende Element aufgezogen wurden. Es ist auch möglich, die Chlorose durch längere Versuchsdauer zu verursachen. Dabei wird der Mangel erst dann akut, wenn die Suspensionen schon sehr dicht sind und nicht mehr nur der Mangel, sondern auch andere Faktoren die weitere Entwicklung beeinflussen. Das Algenmaterial wird inhomogen und die biologische Streuung meistens so gross, dass mit der gewählten Versuchsanordnung Veränderungen des Komponentenverhältnisses nicht mehr signifikant nachgewiesen werden können. Bei kürzeren Versuchen bleibt das Material homogener, und es lassen sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen Mangelkulturen und Kontrollen nachweisen.

Versuche

Mixotroph: Pro Bedingung wurden immer 4 oder 8 Parallelkolben angesetzt. In einem Schüttelkorb fanden 16 Kolben Platz, die jeweils nach dem lateinischen Quadrat angeordnet waren. Analysen wurden nur einmal, je am Ende eines Versuches, von jedem einzelnen Kolben aufgearbeitet.

Autotroph: Die Hauptversuche waren mit je 3 Parallelkulturen pro Bedingung angesetzt. Bestimmungen des Trockengewichtes, des Chlorophyllgehaltes und der Suspensionsdichte konnten während der ganzen Versuchsdauer vorgenommen werden. Die dazu benötigten Algenproben wurden immer zu Beginn der achtstündigen Dunkelperiode mit Pipetten entnommen.

Aufarbeiten des Versuchsmaterials

Bestimmen der Suspensionsdichte

Zum Beurteilen des Wachstums der Kulturen musste eine genaue und rasche Methode gefunden werden. Das Auszählen der Algenzellen in Zählkammern war zu ungenau und sehr zeitraubend und die Volumenbestimmung mit Hämatokriten umständlich. Am geeignetsten und zuver-

lässigsten schien eine Absorptionsmessung. In jüngerer Zeit ist eine Technik ausgearbeitet worden (Shibata et al., 1954, 1958, Butler, 1964), die es gestattet, mit «konventionellen» Spektralphotometern Messungen an stark streuendem Untersuchungsmaterial durchzuführen. Herr Schweizer hat diese Methode an unserem Institut für das Spektralphotometer Unicam SP 600 eingeführt und geprüft (Schweizer, 1965). Er konnte die lineare Beziehung zwischen Konzentration der Algensuspension (bestimmt mit Hämatokriten) und Extinktion für unsere Anordnung bestätigen. Die Absorption der Algensuspension wurde bei einer Wellenlänge (579 nm) gemessen, bei der die Pigmente der Algen in vivo wenig absorbieren, so dass bei den Mangelkulturen kein geringeres Wachstum nur durch die schwächere Chlorophyllabsorption vorgetäuscht werden konnte.

Bestimmen des Trockengewichtes

20–50 cm^3 Algensuspension werden durch ein vorgetrocknetes und gewogenes Filtrierpapier (Schleicher und Schüll Nr. 1575) abgenutscht und mit entsalztem Wasser gewaschen. Darauf wird bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Bestimmen des Chlorophyllgehaltes

Beim Aufarbeiten der Algensuspensionen wurde darauf geachtet, dass die Menge der extrahierten und bestimmten Pigmente immer von der gleichen Grössenordnung war, um den Fehler der ganzen Methode in den gleichen Grenzen zu halten.

Probenentnahme: Je nach der Dichte der Algensuspension werden 4 bis 50 cm^3 abpipettiert, durch ein Filtrierpapier (Schleicher und Schüll Nr. 1575; nach Bursche, 1961) abgenutscht und mit entsalztem Wasser gewaschen. Das verwendete Filtrierpapier hält die Algen quantitativ zurück.

Extraktion der Pigmente: Die Zellen der abfiltrierten Proben werden durch 3 Minuten langes Eintauchen in kochendes Wasser abgetötet. Dann lassen sich die Pigmente quantitativ mit Methanol extrahieren. Um die Chlorophylle vor Oxydation zu schützen, wird $MgCO_3$ zugegeben. Wenn die Proben nicht sofort weiterverarbeitet werden können, bleiben sie bei 0 °C im Dunkeln. Die Extrakte werden abfiltriert, der Rückstand mit Methanol und Äther nachextrahiert und mit Methanol auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt.

Auswaschen der Pigmente: Da es vor allem um eine möglichst genaue Bestimmung des Verhältnisses der beiden Chlorophylle geht und sich diese am sichersten in einer Ätherlösung durchführen lässt, müssen die Pigmente vom Extraktionsmittel Methanol in den Äther übergeführt

werden. Das Methanol muss quantitativ aus dem Äther entfernt sein, wenn es die spektrophotometrische Bestimmung nicht stören soll. Ich entschloss mich zu einer Methode, die Hubert (1935) zum Auswaschen von Chlorophyllösungen verwendete.

In einen Schütteltrichter gibt man 15 bis 20 ml Äther. Dazu wird ein bestimmtes Volumen Methanolextrakt pipettiert und vorsichtig Wasser zugegeben, bis sich die Ätherphase vom Methanol-Wasser-Gemisch getrennt hat. Dann wird ein Wasserzuleitungsröhrchen im Schütteltrichter befestigt und während einer Stunde mit 8–10 cm^3 Wasser pro Minute unter leichtem Druck gewaschen. Nach dieser Zeit ist das Methanol quantitativ aus dem Äther entfernt. Eventuell entstehende Emulsionen können nach dem Auswaschen durch die Zugabe von wenig NaCl getrennt werden. Das Wasser wird von der Ätherlösung abgetrennt und diese auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Vor der spektrophotometrischen Bestimmung wird die Chlorophyllösung noch mit Na_2SO_4 getrocknet.

Durch Filtration über eine Säule von basischem Aluminiumoxyd wurden die Peroxyde aus dem verwendeten Äther (PhH V) entfernt. Die übrigen Lösungsmittel und Substanzen waren analysenrein.

Alle diese Arbeiten wurden bei gedämpftem Licht und zum Teil in einem Kühlraum bei konstanter Temperatur ausgeführt, um die empfindlichen Pigmentlösungen vor der Zerstörung zu schützen und um bei allen Versuchen möglichst gleiche Bedingungen zu schaffen.

Reinheit der Chlorophyllösungen: Die Chlorophyllösungen wurden dünnschichtchromatographisch (Colman und Vishniac, 1964, Egger, 1962) auf eventuelle qualitative Veränderungen in ihrer Zusammensetzung und auf die Abwesenheit von Phäophytinen geprüft.

Spektrophotometrische Bestimmung der Pigmente: Die beiden Chlorophylle a und b lassen sich theoretisch sehr gut quantitativ bestimmen, wenn sie zusammen in einem genau definierten Lösungsmittel vorkommen. Die Methode ist von Comar und Zscheile (1942) beschrieben und seither häufig verwendet worden. Sie beruht auf der Tatsache, dass die beiden Chlorophylle im langwelligen Spektralbereich, in dem die Carotinoide nicht mehr absorbieren, deutliche Absorptionsmaxima aufweisen:

Chlorophyll a – 662 nm
Chlorophyll b – 644 nm (Werte nach Smith und Benitez, 1955)

Wenn die Extinktionskoeffizienten für die beiden Chlorophylle bei den angegebenen Maxima bekannt sind, ist es nach einer Extinktionsmessung bei diesen Wellenlängen möglich, den Chlorophyllgehalt rechnerisch zu ermitteln. Es ist nicht mehr nötig, die beiden Chlorophyllkomponenten chromatographisch zu trennen. Voraussetzung für diese Bestimmungs-

methode ist, dass die Chlorophylle als Zweistoffgemisch vorliegen, dass also keine weiteren Stoffe (z. B. Zersetzungsprodukte: Phäophytine) im Bereich von 640–670 nm absorbieren.

Diese Methode bietet in der Praxis, wenn es um die Bestimmung kleiner Veränderungen des Chlorophyllkoeffizienten geht, Schwierigkeiten. Eine eingehende Untersuchung der Methode haben vor kurzem Ziegler und Egle (1965a) veröffentlicht. Im folgenden sollen zwei auch meine Arbeiten beeinflussende Faktoren besprochen werden.

Für die Messungen stand mir ein Beckman-Spektrophotometer, Modell DU, zur Verfügung. Die Lösungen wurden in Glasküvetten von 1 cm Schichtdicke mit eingeschliffenen Glasstopfen gemessen. Die Spaltbreite betrug 0,045 mm, was eine spektrale Bandbreite von 2 nm ergibt. Das entspricht der von Comar und Zscheile (1942) für analytische Bestimmungen als brauchbar angegebenen Bandbreite. Kleinere Spaltbreiten waren wegen zu geringer Empfindlichkeit der Photozelle nicht möglich. Die Maxima der Chlorophyllösungen deckten sich mit den von Smith und Benitez (1955) angegebenen, weshalb ich für die Berechnungen die Extinktionskoeffizienten dieser Autoren verwendete.

Einstellgenauigkeit: Wie man aus der Beschreibung der Methode sieht, ist es nötig, für jede der Proben bei zwei verschiedenen Wellenlängen die Extinktion zu messen. Die beiden Wellenlängen entsprechen ganz verschiedenen Kurvenpunkten. 662 nm ist das Maximum der Superpositionskurve der beiden Chlorophylle, 644 nm liegt an dessen steiler Flanke. Ungenaue Einstellungen bei 644 nm verursachen relativ grosse Schwankungen im Chlorophyll-b-Gehalt und entsprechend auch im Verhältnis Chlorophyll a/b. Kleinere Schwankungen bei 662 nm wirken sich weit weniger stark aus.

Tabelle 1

Reproduzierbarkeit der Wellenlängeneinstellung

Mittelwerte ($\bar{x}$), Streuung (s) und Streuung in Prozent des Mittelwertes (s %) für die Extinktionen bei 10 Wiederholungen der Wellenlängeneinstellung

Wellenlänge nm	$\bar{x}$	s	s %
662	0,517	0,0026	0,5
644	0,232	0,0021	0,9

In Tabelle 1 sind die Streuungen der Extinktionen bei 10 Wiederholungen der Wellenlängeneinstellung angegeben. Man sieht daraus deutlich, dass der Flankenwert (644 nm) stärker schwankt. Die Bestimmung von

Chlorophyll b und des Koeffizienten Chlorophyll a/b ist mit einem grösseren Fehler behaftet als die Bestimmung von Chlorophyll a. Durch eine grössere Zahl von Einstellungen kann der Fehler reduziert werden, was aber für praktische Arbeiten nicht in Frage kommt. In Tabelle 2 sind die Streuungen aus 60 Einstellungen ermittelt worden. Der Chlorophyllgehalt ist aus den einzelnen Extinktionen berechnet. Die thermische Dejustierung wurde nicht berücksichtigt.

Tabelle 2

Reproduzierbarkeit der Wellenlängeneinstellung

Mittelwerte ($\bar{x}$), Streuung (s) und Streuung in Prozent des Mittelwertes (s %) für die Extinktionen und den Chlorophyllgehalt bei 60 Wiederholungen der Wellenlängeneinstellung

Chlorophyllgehalt in mg/l aus jeder einzelnen Extinktion berechnet

Chlorophyll	Wellenlänge nm	$\bar{x}$	s	s %
	662	0,3539	0,0010	0,3
	644	0,1536	0,0011	0,7
a		3,420	0,0105	0,3
b		1,609	0,0178	1,1
a/b		2,125	0,0250	1,2

Thermische Dejustierung des Monochromators: In der Arbeit von Ziegler und Egle (1965a) wird vor allem auf den Einfluss einer thermischen Dejustierung der Wellenlängenskala auf die Chlorophyllbestimmungen hingewiesen. Durch die zwangsläufige Erwärmung des Monochromators (durch das Licht) verschiebt sich die Wellenlänge gegen den kurzwelligen Spektralbereich. Diese Verschiebung beeinflusst vor allem die Messung an der Absorptionsflanke bei 644 nm sehr stark. Tabelle 3 fasst die Resultate zusammen, die bei einer Verschiebung der Skala um 1 nm gefunden wurden.

Beim Betrachten der Werte für den Koeffizienten Chlorophyll a/b in Tabelle 3 wird klar, dass eine einseitige Beeinflussung der Messungen durch eine thermische Dejustierung unbedingt vermieden werden muss.

Bei dem von mir verwendeten Spektralphotometer konnte ich eine geringe thermische Dejustierung beobachten. Sie liess sich aber praktisch ausschalten. Während der Messpausen, in denen sich die Temperatur der Lösungen an die Temperatur des Probenwechslers anglich, wurde der

Tabelle 3

Einfluss einer (thermisch) dejustierten Wellenlängenskala auf die Bestimmungen von Chlorophyll a, b, a/b

%= Abweichung in Prozent des richtigen Wertes

Abweichung	Chlorophyll a		Chlorophyll b		Chlorophyll a/b	
	mg/l	%	mg/l	%		%
—1 nm	3,94	—0,15	2,04	—3,81	1,93	+3,81
0	3,95	0	2,12	0	1,86	0
+1 nm	3,94	—0,31	2,24	+5,55	1,76	—5,55

Strahlengang zwischen Lichtquelle und Monochromator unterbrochen. Zudem wurden die Lösungen von Parallelkulturen nicht direkt hintereinander, sondern über die ganze Messdauer von ca. 1 Stunde verteilt spektrophotometriert.

Durch mehrfache Einstellung der Wellenlängen und durch die Vermeidung eines Einflusses der thermischen Dejustierung wird der Fehler der spektrophotometrischen Bestimmung für die geplanten Versuche klein genug.

Reproduzierbarkeit der Chlorophyllbestimmungen: In mehreren Versuchen wurde die Streuung der Analysenmethode mit derjenigen des biologischen Materials (Streuung zwischen Parallelkulturen) bei mixotropher und autotropher Anzucht der Algen verglichen. Dabei ergaben sich die in Tabelle 4 zusammengestellten Werte für das Komponentenverhältnis.

Tabelle 4

Reproduzierbarkeit der Chlorophyllbestimmung

Methodische und biologische Streuung des Komponentenverhältnisses

n = Anzahl Einzelwerte

$\bar{x}$ = Mittelwerte (Chl. a/b)

s %= Streuung in Prozent des Mittelwertes

Streuung	methodisch			biologisch+methodisch		
Algen-aufzucht	n	$\bar{x}$	s %	n	$\bar{x}$	s %
mixotroph	6	1,85	1,7	9	1,99	5,3
autotroph	8	2,34	1,8	9	2,32	5,3

Aus diesen Zahlen lässt sich schliessen, dass in den Versuchen statistisch nachgewiesene Veränderungen des Komponentenverhältnisses nicht durch Fehler in der Chlorophyllbestimmungsmethode verursacht sind.

Bezugsgrössen

Der Chlorophyllgehalt wird auf ein willkürlich gewähltes Volumen von 20 oder 40 cm^3 Algensuspension bezogen (= Chl./Susp.). Dies ist eine absolute Basis (Dersch, 1960, Finkle und Appleman, 1953b).

Da eine lineare Beziehung zwischen der Volumenkonzentration ($\sim$ Zellenzahl) und der Extinktion der Algensuspension besteht, ist es in den autotrophen Versuchen möglich, den Chlorophyllgehalt einer konstanten Anzahl Zellen anzugeben (= Chl./E).

In den mixotrophen Versuchen war die Bestimmung der Suspensionsdichte noch nicht möglich. Der Chlorophyllgehalt wird bei diesen Versuchen noch auf das Trockengewicht bezogen (= Chl./TG in mg/g).

Das Komponentenverhältnis Chlorophyll a/b ist dimensionslos und daher die idealste Grösse.

Statistische Auswertung

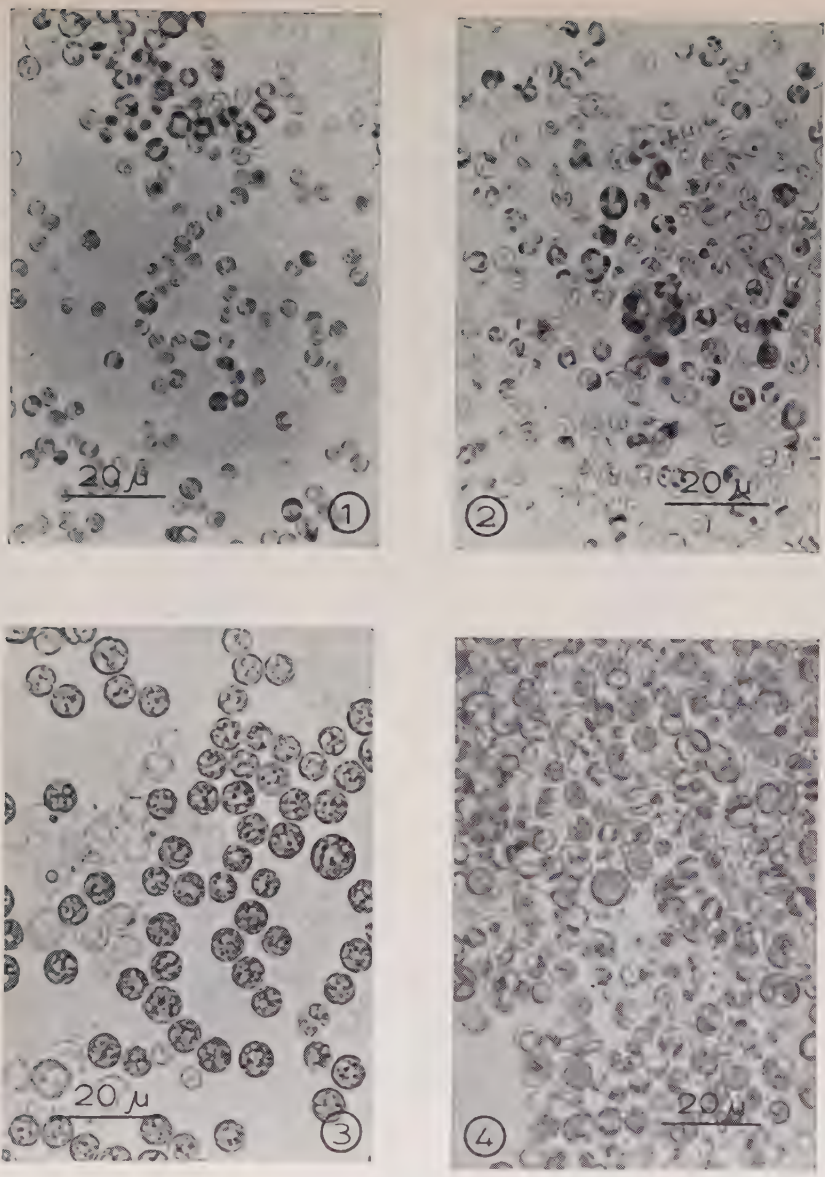
Wenn Veränderungen des Chlorophyllkoeffizienten sicher nachgewiesen werden sollen, ist wegen der gefundenen relativ grossen biologischen Streuung eine genaue statistische Auswertung der Versuche unerlässlich. Die Resultate der Versuche wurden durch Varianzanalysen gesichert und die Mittelwerte mit dem Duncan-Test nach signifikanten Grössenunterschieden untersucht (Linder, 1964, Documenta Geigy, 1960).

Die Berechnung sämtlicher Daten und ihre statistische Auswertung konnten mit der elektronischen Datenverarbeitungsmaschine IBM 1620 der Universität Basel ausgeführt werden.

Versuche

Eisenmangel

Schon sehr lange ist bekannt, dass das Eisen für die Chlorophyllbildung wichtig ist (Gris, 1844). Eine Chlorose, verursacht durch das Fehlen des Elementes, ist aber nur eine Sekundärerscheinung, da das Eisen selbst im Chlorophyll nicht vorkommt. In den letzten Jahren wurde in mehreren Arbeiten versucht, den Angriffspunkt des Eisens in der Chlorophyllsynthese zu finden (Marsh et al., 1963a, 1963b, Karali und Price, 1963, Price und Carell, 1964, Carell und Price, 1965). Über eine Verände-



Figur 2

Autotrophe Aufzucht von *Muriella*

1 Normalkultur
2 Eisenmangelkultur
3 Stickstoffmangelkultur
4 Mg-Mangelkultur

rung des Chlorophyllquotienten bei einem Eisenmangel ist noch sehr wenig bekannt (Dersch, 1960).

Zum Studium des Eisenmangels wurden die Algen bei vier verschiedenen Eisenkonzentrationen in mixotropher wie in autotropher Kultur aufgezogen: die Kontrollen enthielten 10 γ Fe pro Liter Nährlösung, Fe_1 noch 1 γ ($= {}^1/_{10}$), Fe_2 0,1 γ ($= {}^1/_{100}$) und Fe_0 kein Eisen.

Als Mass für das Wachstum wurde in den autotrophen Versuchen die Suspensionsdichte (E) gemessen.

Eine von Pirson und anderen (1952) bei *Ankistrodesmus* gefundene Verkleinerung der Eisenmangelzellen wurde weder bei *Dictyococcus* noch bei *Muriella* beobachtet. In mixotrophen Mangelkulturen waren die Zellen sogar durchschnittlich grösser. Die Abgrenzung der Chloroplasten, die in Normalkulturen sehr gut sichtbar ist, wurde undeutlich, und vielfach wies der Zellinhalt eine «körnige Struktur» auf (vgl. Fig. 2). Tote Zellen fanden sich keine.

In den Vorversuchen zeigten sich bereits die bekannten Erscheinungen des Eisenmangels (Emerson, 1929, Pirson et al., 1952, Dersch, 1960): geringeres Wachstum und kleinerer Chlorophyllgehalt (vgl. Tab. 10). Auch der Chlorophyllkoeffizient war erniedrigt, was aber erst nach einer Vorkultur der Algen in Fe-freier Nährlösung statistisch gesichert werden konnte (Chlorophyll a/b: Kontrolle $= 2{,}28 > Fe_0 = 1{,}70$; Signifikanzwahrscheinlichkeit 0,01). In den Hauptversuchen liessen sich die Veränderungen aller untersuchten Grössen statistisch sichern.

Tabelle 5

Mixotropher Eisenmangelversuch mit *Dictyococcus*
Vorkultur 6 Tage, Versuch 6 Tage

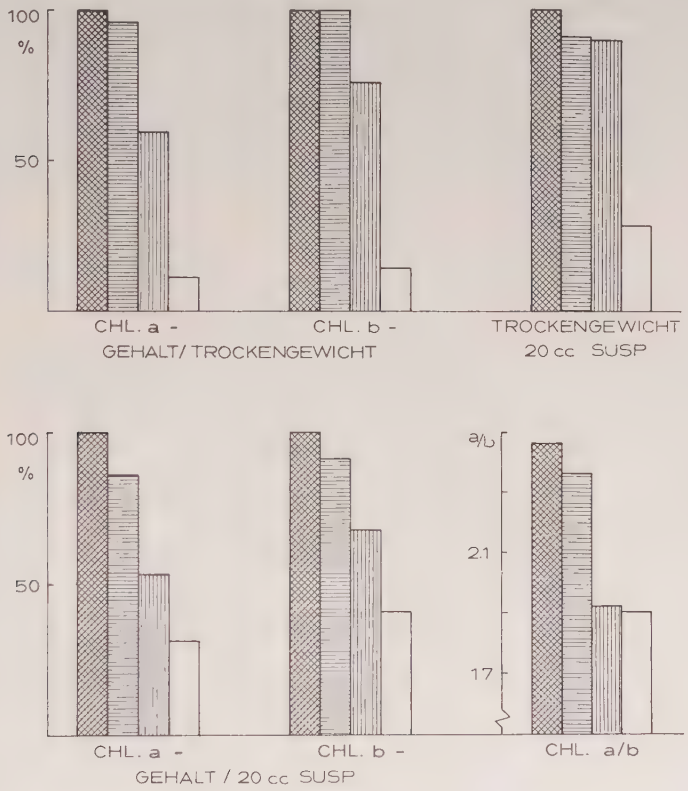
Mittelwerte aus 8 Parallelkulturen. Die unterstrichenen Werte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Duncan-Test: Signifikanzwahrscheinlichkeit 0,01)

Chl./TG: Chlorophyllgehalt in mg/g Trockengewicht
Chl./Susp.: Chlorophyllgehalt in mg/20 cm³ Algensuspension

	Kontrolle 10 γ Fe/l	Fe_1 ${}^1/_{10}$	Fe_2 ${}^1/_{100}$	Fe_0 0
Chl. a/Susp.	1,07	0,92	0,57	0,03
Chl. b/Susp.	0,43	0,39	0,29	0,01
Chl. a/TG	17,76	17,06	10,54	1,94
Chl. b/TG	7,21	7,22	5,47	1,02
Chl. a/b	2,46	2,36	1,92	1,90

In Tabelle 5 und Figur 3 sind die Resultate eines Eisenmangelversuches bei *mixotropher* Anzucht zusammengefasst. Versuchsorganismus war *Dictyococcus*. Die Vorkultur dauerte 6 Tage, der Versuch ebenfalls 6 Tage.

Alle Eisenkonzentrationen, ausser Fe_0, reichen für eine nahezu normale Substanzproduktion aus. Das Trockengewicht ist in den Kulturen Fe_1 und Fe_2 nur um etwa 10 % gegenüber der Kontrolle reduziert. Der Chlorophyllgehalt ist stark von der vorgegebenen Eisenmenge abhängig. Die pro Volumeneinheit Algensuspension gebildete Chlorophyllmenge nimmt mit der Fe-Konzentration signifikant ab. Bezieht man den Chlorophyllgehalt auf das Trockengewicht, so findet man bei der Konzentration Fe_1



Figur 3

Mixotropher Eisenmangelversuch mit *Dictyococcus*

Vorkultur 6 Tage, Versuch 6 Tage. Mittelwerte aus 8 Parallelkulturen

Alle Werte, ausser Chloropyll a/b, sind in Prozent der Kontrolle angegeben

Gekreuzt schraffiert:	Kontrolle	= 10 γ Fe/l
Quer schraffiert:	Fe_1	= 1,0 γ Fe/l
Senkrecht schraffiert:	Fe_2	= 0,1 γ Fe/l
Weiss:	Fe_0	= kein Eisen

noch keinen signifikanten Unterschied von der Kontrolle, da das Trockengewicht wie der Chlorophyllgehalt abgenommen haben. Das Komponentenverhältnis wird offenbar nur bei sehr starkem Eisenmangel beeinflusst. Eine Eisenkonzentration von $^1/_{10}$ der Kontrolle bringt nur eine schwache, nicht signifikante Verschiebung. In den Kulturen Fe_2 und Fe_0 wird das Verhältnis signifikant zugunsten von Chlorophyll b verschoben, in beiden praktisch gleich stark. In ihrer Wirkung auf das Komponentenverhältnis entspricht eine Nährlösung mit einer Eisenkonzentration von 0,1 γ/l einer Nährlösung ohne jede Eisenzugabe.

Dersch (1960) schliesst aus seinen autotrophen Versuchen, dass ein Teil der Hemmung der Chlorophyllsynthese durch den Eisenmangel auf eine Wirkung des Lichtes zurückzuführen sei. Um die Frage der Wirkung äusserer Faktoren auf Eisenmangelzellen zu klären, wurden die Algen in mixotropher Kultur bei zwei verschiedenen Temperaturen und in heterotropher Kultur (verdunkelt) gezogen. Vorkultur und Versuchsdauer betrugen je 6 Tage. Tabelle 6 fasst die Resultate dieses Versuches zusammen.

Tabelle 6

Einfluss des Lichtes und der Temperatur auf Eisenmangelzellen von *Dictyococcus*

Fe: + = 10 γ/l — = kein Eisen

Chl./Susp.: totaler Chlorophyllgehalt in mg/20 cm³ Algensuspension

Chl./TG: totaler Chlorophyllgehalt in mg/g Trockengewicht

TG: Trockengewicht von 20 cm³ Algensuspension in mg

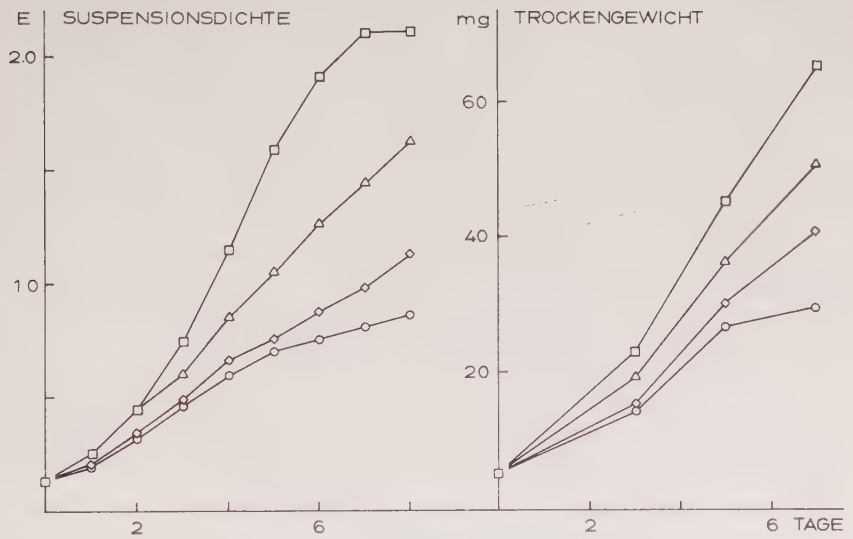
Mittelwerte aus 4 Parallelkolben

	Fe	Licht, 25 °C mixotroph		Dunkel, 25 °C heterotroph		Licht, 30 °C mixotroph	
			%		%		%
Chl./Susp.	+	1,30	100	0,54	100	0,40	100
	—	0,06	4,7	0,02	5,3	0,05	12,8
Chl./TG	+	22,34	100	14,80	100	10,34	100
	—	2,33	10,5	1,91	12,9	2,53	24,5
TG	+	58,80	100	36,95	100	49,15	100
	—	26,45	45	15,11	41	20,25	41
Chl. a/b	+	2,32	100	1,80	100	2,25	100
	—	1,84	79	1,64	91	1,75	78

Es ist unter allen Bedingungen eine deutliche Wirkung des Eisenmangels auf die Chlorophyllsynthese festzustellen. In den heterotrophen Mangelkulturen findet man einen etwas höheren Chlorophyllgehalt (5,3 %; in Prozent der Normalkultur) als in den mixotrophen (4,7 %). Der Unterschied ist sehr klein und deutet meiner Ansicht nach auf keinen Lichteinfluss. Eine Temperaturerhöhung wirkt sich vor allem auf die Chlorophyllsynthese nachteilig aus. Bei 30 °C hat ein Eisenmangel eine geringere Wirkung auf die Chlorophyllsynthese. Das Komponentenverhältnis wird von einer Temperaturerhöhung praktisch nicht beeinflusst und zeigt für Eisenmangel dieselbe Verschiebung wie bei 25 °C.

In heterotropher Normalkultur ist das Verhältnis Chlorophyll a/b zugunsten von Chlorophyll b verschoben. Diese Beobachtung konnte schon in Vorkulturen beim Vergleich von heterotrophem und mixotrophem Wachstum gemacht werden und wird auch von Dersch (1960) für *Ankistrodesmus* mitgeteilt.

Die *autotrophen* Versuche fielen prinzipiell gleich aus wie die mixotrophen. Das Wachstum, die Substanzproduktion und die Chlorophyll-



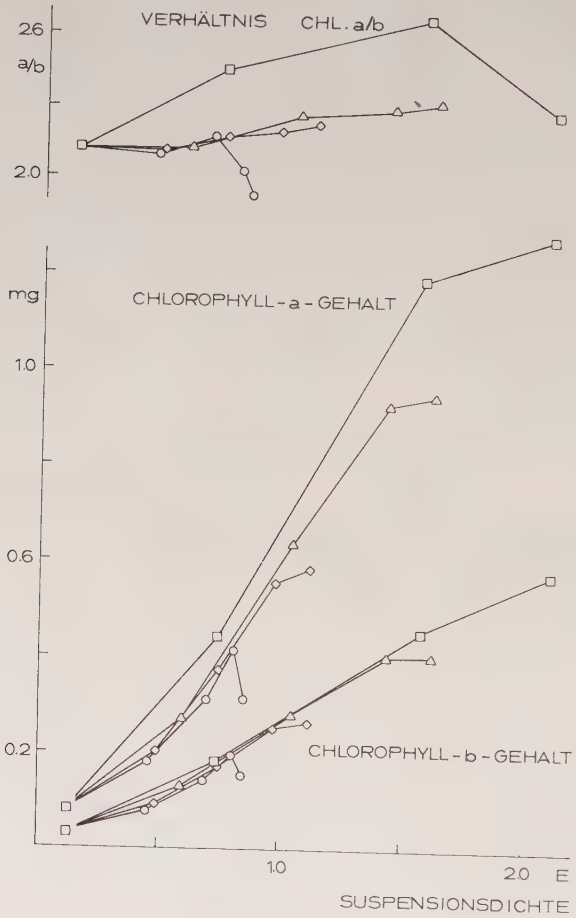
Figur 4

Autotropher Eisenmangelversuch mit *Muriella*
Vorkultur 7 Tage Versuch 8 Tage

Veränderungen der Suspensionsdichte und des Trockengewichtes in Funktion der Zeit
Mittelwerte aus 3 Parallelkulturen

□ Kontrolle = 10 γ Fe/l
△ Fe_1 = 1,0 γ Fe/l
◇ Fe_2 = 0,1 γ Fe/l
○ Fe_0 = kein Eisen

synthese der Algen sind von der Eisenkonzentration abhängig. Das Komponentenverhältnis verändert sich bei Eisenmangel zugunsten von Chlorophyll b. Bei diesen Versuchen ist es möglich, die Resultate in Funktion der Suspensionsdichte und damit in Funktion der Zellenzahl darzustellen.



Figur 5

Autotropher Eisenmangelversuch mit *Muriella*

Vorkultur 7 Tage Versuch 8 Tage

Veränderungen des Chlorophyllgehaltes und des Komponentenverhältnisses in Funktion der Suspensionsdichte

Mittelwerte aus 3 Parallelkulturen

□ Kontrolle = 10 γ Fe/l
△ Fe_1 = 1,0 γ Fe/l
◇ Fe_2 = 0,1 γ Fe/l
○ Fe_0 = kein Eisen

In den Figuren 4 und 5 sind die Veränderungen der Suspensionsdichte und des Trockengewichtes bzw. des Chlorophyllgehaltes und des Komponentenverhältnisses im Verlaufe eines autotrophen Eisenmangelversuches aufgezeichnet. Die Vorkultur betrug 7 Tage, die Versuchsdauer 8 Tage. Versuchsobjekt war *Muriella*.

Beim Vergleich der pro Volumeneinheit Algensuspension vorhandenen Chlorophyllmengen ist bereits nach 3 Tagen in allen Mangelkulturen signifikant weniger Chlorophyll vorhanden als in den Kontrollen. Eine Veränderung des Chlorophyllkoeffizienten ist nach 5 Tagen als signifikant zu betrachten.

Aufschlussreich ist die Darstellung der Veränderungen in Abhängigkeit der Suspensionsdichte anstelle der Zeit. Der Chlorophyllgehalt nimmt anfänglich in allen Kulturen ziemlich gleichmässig zu. Das Eisen scheint lediglich die Geschwindigkeit der Zellvermehrung und der Chlorophyllsynthese stärker zu beeinflussen. Erst gegen Ende des Versuches, wenn in den Kontrollen bereits die maximale Zelldichte erreicht ist, macht sich der Mangel in einer verringerten Chlorophyllsynthese bemerkbar, in den Kulturen Fe_0 sogar in einem Abbau des Chlorophylls. Aus der Verschiebung des Komponentenverhältnisses muss geschlossen werden, dass Chlorophyll a davon mehr betroffen wird als Chlorophyll b.

Der relativ starke Anstieg des Koeffizienten Chlorophyll a/b in den Kontrollkulturen war bei Eisenmangelversuchen immer zu beobachten. Er hängt vermutlich mit einer intensiveren Chlorophyll-a-Synthese nach einer Rückkehr von Eisenmangelzellen aus der Vorkultur in eine normale Nährlösung zusammen. In Vorversuchen war dieselbe Verschiebung beobachtet worden, wenn zur Mangelkultur das fehlende Eisen zugegeben wurde (Tab. 7). Die geringe Verschiebung des Chlorophyllkoeffizienten in den Kulturen Fe_1 und Fe_2 lässt sich ebenfalls damit begründen. Nach längerer Versuchsdauer fand ich in den Kulturen Fe_2 ebenfalls eine Verschiebung zugunsten von Chlorophyll b.

Qualitative Veränderungen in der Pigmentgarnitur von Eisenmangelzellen wurden keine beobachtet.

Tabelle 7

Regeneration von Eisenmangelzellen

Autotrophe Kultur von *Muriella*

	Fe_0 Chl. a/b	Kontrolle Chl. a/b
Vor Fe-Zugabe	2,09	2,15
Nach Fe-Zugabe	2,32	2,11

In den mixotrophen wie auch autotrophen Eisenmangelversuchen ergab sich bei extremem Mangel eine signifikante Verschiebung des Komponentenverhältnisses zugunsten von Chlorophyll b.

Stickstoffmangel

Das Fehlen des Stickstoffes, eines Bausteins der Aminosäuren, und damit der Eiweisse lässt die gesamte Eiweissynthese stillstehen. Die Zellen teilen sich nicht mehr, da nur noch beschränkt Eiweisskörper vorhanden sind. Die Kohlensäureassimilation kann aber weitergehen und verursacht durch die Anhäufung von Kohlenhydraten und Fetten eine Vergrösserung der Zellen (Aach, 1954, Jaaska, 1964). Die Konzentration der Farbstoffe, Chlorophylle und Carotinoide, nimmt ab (Aach, 1953, Dersch, 1960, Hase et al., 1957, Sud'yina et al., 1964), und das Komponentenverhältnis wird dabei verschoben.

Der Stickstoffmangel wurde in mixotrophen und autotrophen Versuchen mit vier verschiedenen Nitratkonzentrationen untersucht: die Kontrolle enthielt 0,173 g N/l (als KNO_3), N_1 noch $^1/_{10}$ der Kontrolle, N_2 $^1/_{100}$ und N_0 gar keinen Stickstoff. Als osmotischer Ersatz für das fehlende Nitrat wurde KCl in äquimolarer Menge zur Nährlösung gegeben. Eine Vorkultur war nicht nötig.

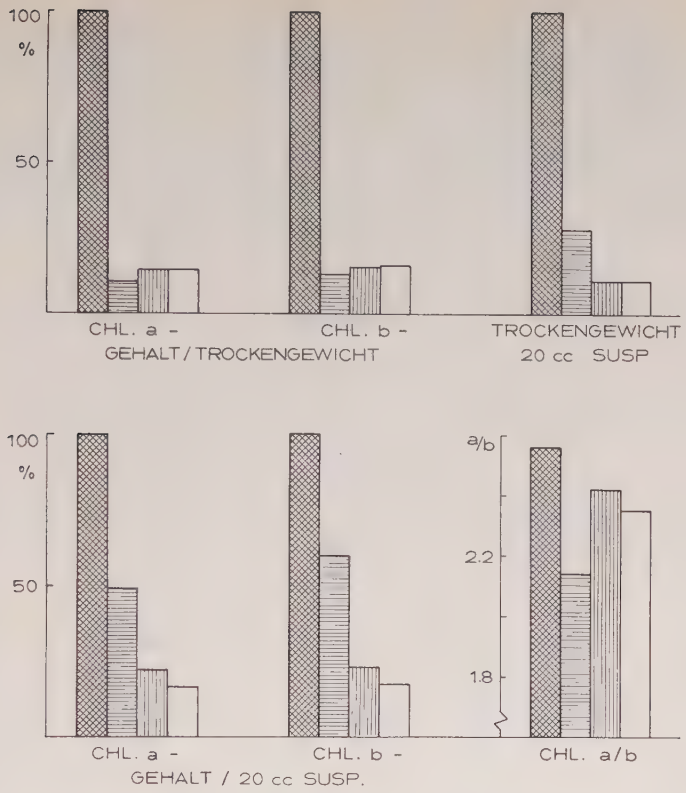
Als Mass für das Wachstum wurde in den autotrophen Versuchen die Suspensionsdichte (E) gemessen.

Stickstoffmangelkulturen unterscheiden sich nach kurzer Zeit bereits äusserlich durch ihre gelb-orange Färbung von den Normalkulturen. Im Mikroskop (vgl. Fig. 2) sind die Mangelzellen unregelmässiger und durchschnittlich grösser. Chloroplasten lassen sich nicht mehr recht erkennen. Die Zellen sind voll Fetttropfen.

Tabelle 8

Mixotropher Stickstoffmangelversuch mit *Dictyococcus*
Keine Vorkultur Versuchsdauer 5 Tage
Mittelwerte aus 8 Parallelkolben
Chl. a/TG: Chlorophyll-a-Gehalt in mg/g Trockengewicht
TG: Trockengewicht von 40 cm³ Algensuspension

	Versuchs-beginn	Nach 5 Tagen			
		Kontrolle	N_1	N_2	N_0
TG	3,0	96,3	27,0	10,6	10,8
Chl. a/TG	23,65	21,33	2,25	3,15	3,16
Chl. a/b	2,44	2,55	2,14	2,42	2,35



Figur 6

Mixotropher Stickstoffmangelversuch mit *Dictyococcus*
Keine Vorkultur. Versuchsdauer 5 Tage. Mittelwerte aus 8 Parallelkulturen
Alle Werte, ausser Chlorophyll a/b, sind in Prozent der Kontrolle angegeben

Gekreuzt schraffiert:	Kontrolle	= 0,173 g N/l
Quer schraffiert:	N_1	= 0,0173 g N/l
Senkrecht schraffiert:	N_2	= 0,00173 g N/l
Weiss:	N_0	= kein Stickstoff

Der Chlorophyllgehalt, bezogen auf das Trockengewicht wie auch auf eine bestimmte Suspensionsmenge, sinkt in Stickstoffmangelkulturen sehr stark. Die Algen enthalten bei gleicher Versuchsdauer und gleichem Impfmaterial signifikant weniger Chlorophyll als selbst Eisen- oder Magnesiummangelzellen (Tab. 10).

In Tabelle 8 und Figur 6 sind die Resultate eines *mixotrophen* Stickstoffmangelversuches mit *Dictyococcus* zusammengestellt. Der Versuch dauerte 5 Tage.

Nicht nur der Chlorophyllgehalt, sondern auch das Trockengewicht ist trotz mixotropher Ernährung bei Stickstoffmangel stark reduziert. Das Komponentenverhältnis ist zugunsten von Chlorophyll b verschoben, aber es unterscheidet sich nur der Wert aus den Kulturen N_1, dem schwächsten Mangel, signifikant von den Kontrollen (Signifikanzwahrscheinlichkeit 0,01). Bei stärkerem Stickstoffmangel ist das Komponentenverhältnis nach 5 Tagen nicht signifikant von den Kontrollen verschieden.

Tabelle 9

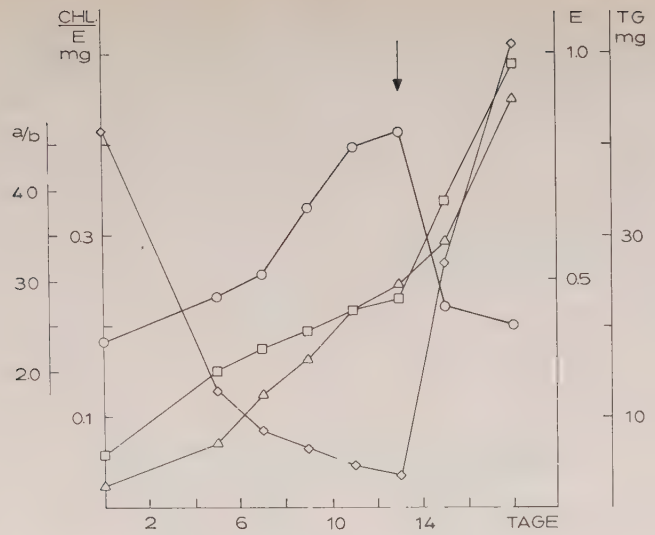
Autotropher Stickstoffmangelversuch mit *Muriella*
Keine Vorkultur. Versuchsdauer 18 Tage
Nach 13 Tagen Mangelaufzucht wird der fehlende Stickstoff zugegeben
TG: Trockengewicht von 20 cm³ Algensuspension in mg

Tage	Suspensionsdichte E	TG mg	Chl. a/b	Chl. a+b/E mg
0	0,116	2,5	2,34	0,418
5	0,303	7,2	2,83	0,129
7	0,350	12,5	3,08	0,084
9	0,392	16,5	3,81	0,065
11	0,439	22,0	4,47	0,046
13	0,462	24,5	4,64	0,035
15	0,677	29,2	2,70	0,269
18	0,978	44,8	2,50	0,510

Bereits in den *autotrophen* Vorversuchen fand ich neben der extremen Abnahme des Chlorophyllgehaltes eine im Vergleich mit den mixotrophen Versuchen entgegengesetzte Komponentenverschiebung, also zugunsten von Chlorophyll a. Nach der Zugabe des fehlenden Stickstoffes war die Chlorophyll-b-Synthese intensiver und das Komponentenverhältnis sehr bald wieder auf einem normalen Wert (Tab. 9 und Fig. 7).

In den Figuren 8 und 9 sind die Ergebnisse eines Stickstoffmangelversuches bei autotropher Anzucht von *Muriella* in vier verschiedenen Nitratkonzentrationen zusammengefasst. Die Versuchsdauer betrug 10 Tage, und geimpft wurden Zellen aus einer Normalkultur.

Das Wachstum ist stark von der Nitratkonzentration abhängig. Nach 5 Tagen nimmt die Suspensionsdichte in den Mangelkulturen nicht mehr zu, die Zellen teilen sich nicht mehr. Das Trockengewicht hingegen steigt



Figur 7

Autotropher Stickstoffmangelversuch mit *Muriella*

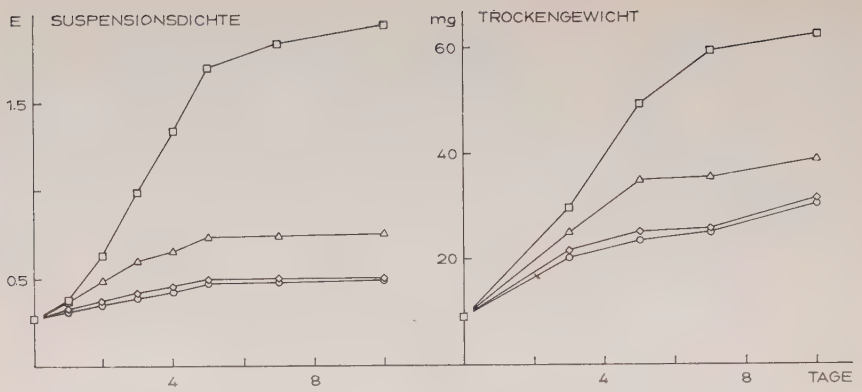
Versuchsdauer 18 Tage: 13 Tage Mangelkultur
5 Tage Regeneration

Veränderungen der Suspensionsdichte, des Trockengewichtes, des Chlorophyllgehaltes und des Komponentenverhältnisses in Funktion der Zeit

□ Suspensionsdichte (E)
△ Trockengewicht (TG)
◇ Chlorophyllgehalt (a+b) der Zellen (Chl./E)
○ Komponentenverhältnis (Chl. a/b)
⬇ N-Zugabe

offenbar infolge von Reservestoffspeicherung noch bis zum Versuchsende an. Auch nach längerem, extremem Mangel sterben keine Zellen ab, und die noch vorhandenen Pigmente bleiben funktionstüchtig, sonst wäre in autotropher Kultur keine Kohlenhydratsynthese und damit auch keine Reservestoffspeicherung möglich.

Die Veränderung im Pigmentgehalt der Zellen wird am deutlichsten sichtbar, wenn die Chlorophyllkonzentration mit Hilfe der Suspensionsdichte als Mass für die Zellenzahl auf eine für den ganzen Versuch konstante Anzahl Zellen bezogen ist (Fig. 9). In der Normalzelle schwankt der Chlorophyllgehalt nur sehr wenig, der Gehalt an Chlorophyll a stärker als der an Chlorophyll b. In den Mangelzellen fällt der Chlorophyllgehalt zu Beginn sehr steil ab. Dabei wird in den Kulturen N_0 bereits mehr Chlorophyll b abgebaut als Chlorophyll a, der Koeffizient Chlorophyll a/b steigt. In den Kulturen N_1 und N_2 wird bis zum dritten Tag mehr Chlorophyll a abgebaut, der Koeffizient sinkt. Nach dem dritten Tag steigt der



Figur 8

Autotropher Stickstoffmangelversuch mit *Muriella*

Keine Vorkultur Versuch 10 Tage

Veränderungen der Suspensionsdichte und des Trockengewichtes in Funktion der Zeit

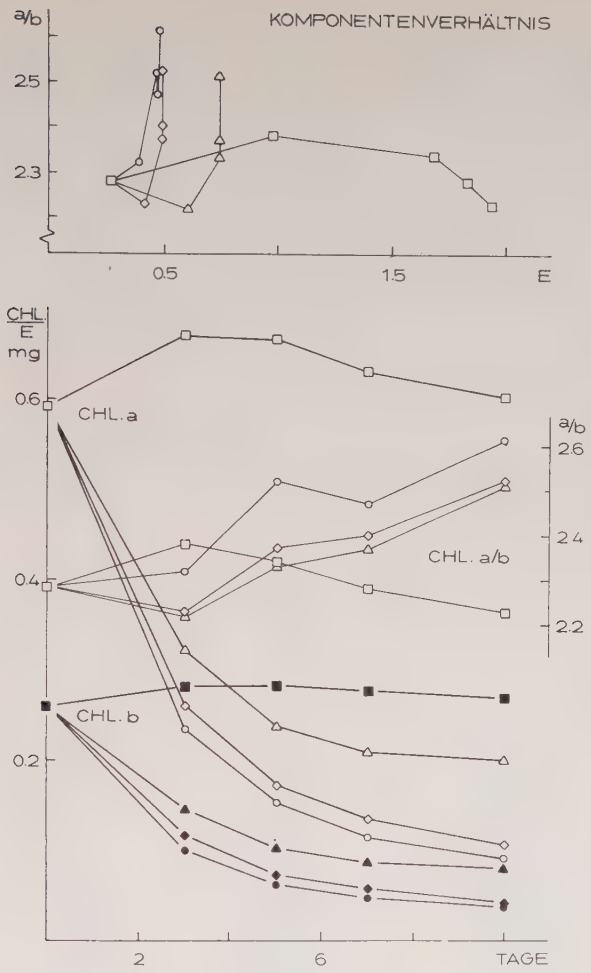
Mittelwerte aus 3 Parallelkulturen

□ Kontrolle = 0,173 g N/l
△ N_1 = 0,0173 g N/l
◇ N_2 = 0,00173 g N/l
○ N_0 = kein Stickstoff

Koeffizient in allen Mangelkulturen, es wird im Verhältnis mehr Chlorophyll b abgebaut. Unter den beschriebenen Mangelbedingungen scheint Chlorophyll b labiler zu sein. Bei Dersch (1960) finden sich für Starklichtkulturen von *Ankistrodesmus* gleichsinnige Verschiebungen des Komponentenverhältnisses.

Qualitative Veränderungen der Pigmentgarnitur wurden keine beobachtet. Die für die gelb-orange Färbung der Mangelkulturen verantwortlichen Farbstoffe (nach chromatographischen und spektrophotometrischen Prüfungen hauptsächlich β-Carotin) fanden sich in den eingelagerten Fetttropfen der Zellen.

Unter mixotrophen Stickstoffmangelbedingungen beobachtete ich eine Chlorophyllkomponentenverschiebung zugunsten von Chlorophyll b, unter autotrophen hingegen eine Verschiebung zugunsten von Chlorophyll a.



Figur 9

Autotropher Stickstoffmangelversuch mit *Muriella*

Keine Vorkultur Versuch 10 Tage

Veränderungen des Komponentenverhältnisses in Funktion der Suspensionsdichte und Veränderungen des Chlorophyllgehaltes und des Komponentenverhältnisses in Funktion der Zeit

Mittelwerte aus 3 Parallelkulturen

□ Kontrolle = 0,173 g N/l
△ N_1 = 0,0173 g N/l
◇ N_2 = 0,00173 g N/l
○ N_0 = kein Stickstoff

Der Magnesiummangel ist in seinen Auswirkungen zum Teil denjenigen des Stickstoffmangels ähnlich (Galling, 1963). Die Zellteilung wird bei einer Zelldichte unterbrochen, die der Anfangskonzentration an Magnesium proportional ist, während die Zellmaterialsynthese noch einige Zeit weitergehen kann (Finkle und Appleman, 1953a). Der Chlorophyllgehalt der Zellen nimmt stark ab (Finkle und Appleman, 1953b, Pirson et al., 1952). Die Mangelzellen sind durchschnittlich grösser und haben die Tendenz zu aggregieren (Pirson et al., 1952, Rodhe, 1948). Bestimmungen des Chlorophyllkoeffizienten wurden von Dersch (1960) veröffentlicht, deuten aber auf keinen signifikanten Einfluss des Magnesiums hin.

Die Algen wurden in Nährlösungen mit verschiedenem $MgSO_4$-Gehalt aufgezogen: die Kontrollen enthielten 0,0985 g Mg/l, Mg_1 noch $^1/_{10}$ der Kontrolle, Mg_2 $^1/_{100}$, Mg_3 $^1/_{1000}$ und Mg_0 gar kein Magnesium. Als osmotischer Ersatz für das fehlende $MgSO_4$ wurde Na_2SO_4 in äquimolarer Menge in die Nährlösung gegeben.

Als Mass für das Wachstum benutzte ich nicht die Suspensionsdichte, sondern das Trockengewicht, da sich in Magnesiummangelkulturen die Zellen zu Zellhaufen zusammenschlossen (vgl. Vischer, 1926).

Die Mangelzellen von *Dictyococcus* und *Muriella* waren grösser als Normalzellen (vgl. Fig. 2). Der Zellinhalt hatte zum Teil eine körnige Struktur, wie das Galling (1963) für *Chlorella* beschrieben hat, und die Chloroplasten waren blassgrün und nicht mehr deutlich sichtbar.

In Magnesiummangelkulturen wurden selbst bei vorsichtigster, steriler Anzucht immer Bakterien beobachtet. Vermutlich leben diese mit den

Tabelle 10

Chlorophyllgehalt (Chlorophyll a + b) verschiedener Mangelkulturen von *Dictyococcus*
Chl./TG: Chlorophyllgehalt in mg/g Trockengewicht
Chl./Susp.: Chlorophyllgehalt in mg/20 cm³ Algensuspension

	Aufzucht	Tage	Kontrolle	Mg_0	N_0	Fe_0
Chl./TG	mixotroph	6	32,05	16,23	3,50	18,76
	autotroph	5	33,06	14,30	2,55	26,74
Chl./Susp.	mixotroph	6	1,36	0,40	0,01	0,96
	autotroph	5	0,83	0,27	0,03	0,52

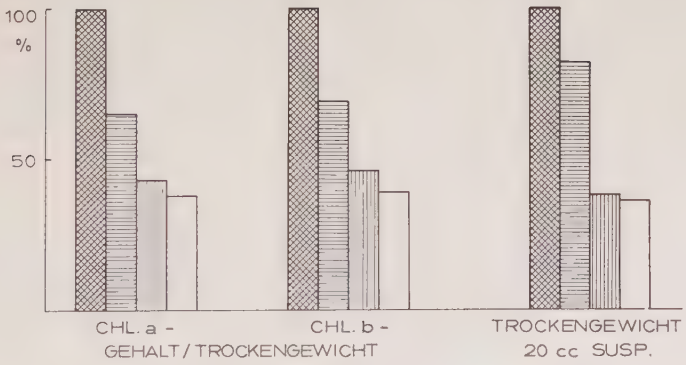
Algen zusammen (vgl. Ruschmann, 1956) und treten unter normalen, für die Algen vorteilhaften Bedingungen gar nicht in Erscheinung.

Eine Verringerung des Chlorophyllgehaltes als Folge eines Magnesiummangels lässt sich ohne eine Vorkultur nachweisen (Tab. 10). Das Komponentenverhältnis bleibt dabei unverändert. Nach einer Vorkultur von 7 Tagen konnte in einem mixotrophen Vorversuch eine Veränderung des Koeffizienten zugunsten von Chlorophyll b festgestellt werden (Tab. 11), allerdings mit einer geringen Signifikanzwahrscheinlichkeit von 0,05.

Tabelle 11

Mixotropher Magnesiummangelversuch mit *Dictyococcus*
Vorkultur 7 Tage Versuch 8 Tage
Mittelwerte aus 8 Parallelkulturen
TG: Trockengewicht von 40 cm³ Algensuspension in mg
Chl./Susp.: Chlorophyllgehalt von 40 cm³ Algensuspension in mg

	Chl./TG	TG	Chl./Susp.	Chl. a/b
Kontrolle	26,19	101,4	2,65	2,28
Mg_0	10,23	42,0	0,42	1,87



Figur 10

Mixotropher Magnesiummangelversuch mit *Dictyococcus*
Vorkultur 4 Tage Versuch 10 Tage
Mittelwerte aus 8 Parallelkulturen
Alle Werte sind in Prozent der Kontrolle angegeben
Gekreuzt schraffiert: Kontrolle = 98,5 mg Mg/l
Quer schraffiert: Mg_2 = 0,985 mg Mg/l
Senkrecht schraffiert: Mg_3 = 0,0985 mg Mg/l
Weiss: Mg_0 = kein Magnesium

Tabelle 12 und Figur 10 fassen die Resultate eines *mixotrophen* Magnesiummangelversuches mit *Dictyococcus* zusammen. Die Vorkultur dauerte 4 Tage, der Versuch 10 Tage.

In allen mixotrophen Versuchen war der Chlorophyllgehalt der Mangelkulturen signifikant geringer als derjenige der Kontrollkulturen. Das Trockengewicht war trotz mixotropher Ernährung reduziert, stärker als bei Eisenmangel, aber wesentlich schwächer als bei Stickstoffmangel. In den Mangelkulturen war zwar das Verhältnis Chlorophyll a/b immer zugunsten von Chlorophyll b verschoben, die Mittelwerte unterschieden sich aber nicht signifikant voneinander, weil die Streuung zwischen den Parallelkolben zu gross war.

Tabelle 12

Mixotropher Magnesiummangelversuch mit *Dictyococcus*
Vorkultur 4 Tage Versuch 10 Tage

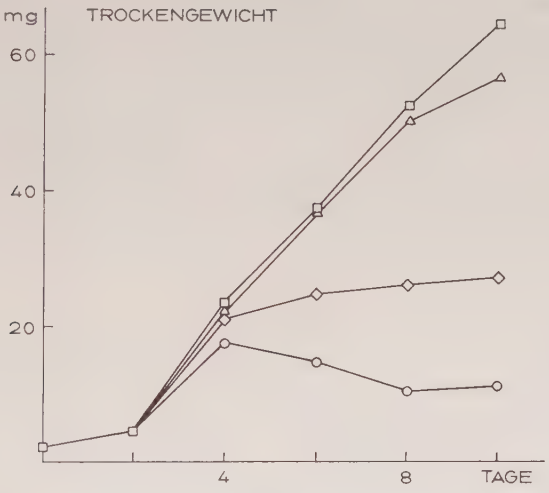
Mittelwerte aus 8 Parallelkolben
Varianzanalyse: Tabellenwert $F_{0,01;\ 3;\ 28} = 4{,}57$
Duncan-Test: Die unterstrichenen Werte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Signifikanzwahrscheinlichkeit 0,01)
Chl./TG: Chlorophyllgehalt in mg/g Trockengewicht

	Kontrolle	Mg_2	Mg_3	Mg_0	F
Chl. a/TG	19,77	12,81	8,55	7,48	176,12
Chl. b/TG	8,49	5,85	3,91	3,31	107,21
Chl. a/b	2,34	2,19	2,19	2,26	1,60

In den Figuren 11 und 12 sind die Resultate eines *autotrophen* Magnesiummangelversuches dargestellt. Er dauerte 10 Tage. Das Versuchsobjekt, *Muriella*, war in einer Vorkultur während 7 Tagen ohne Magnesiumzugabe gewachsen. Nach dieser Zeit waren die Zellen noch voll teilungsfähig und relativ chlorophyllreich (Chlorophyll a + b = 41,8 mg/g TG). Das Komponentenverhältnis war zugunsten von Chlorophyll b etwas verschoben (Chlorophyll a/b = 2,11).

Nach einem Angewöhnen an die Versuchsbedingungen während zweier Tage mit einer in allen Kulturen gleich geringen Trockengewichtszunahme setzt eine stärkere, von der vorgegebenen Magnesiumkonzentration abhängige Zunahme ein. In den Kontrollkulturen bleibt diese konstant und von gleicher Grössenordnung bis zum Versuchsabbruch nach 10 Tagen. In den Mangelkulturen Mg_1 wird die Trockengewichtszunahme

nach dem achten Tage geringer und in den Mangelkulturen Mg_2 und Mg_0 sogar schon nach dem vierten Tage. Während in den Kulturen Mg_1 und Mg_2 noch bis zum Versuchsende eine geringe Trockengewichtszunahme der Algen festzustellen ist, sinkt das Trockengewicht in den völlig magnesiumfreien Kulturen. Eine Trockengewichtsabnahme wurde von Pirson und Badour (1960) bei Kaliummangelzellen und von Böger (1964) bei Magnesiummangelzellen beobachtet. Ob die geringe Trockengewichtszunahme in den Kulturen Mg_1 und Mg_2 durch Zellteilungen oder nur durch Substanzvermehrung verursacht wird, lässt sich mit den vorhandenen Daten nicht entscheiden.



Figur 11

Autotropher Magnesiummangelversuch mit *Muriella*

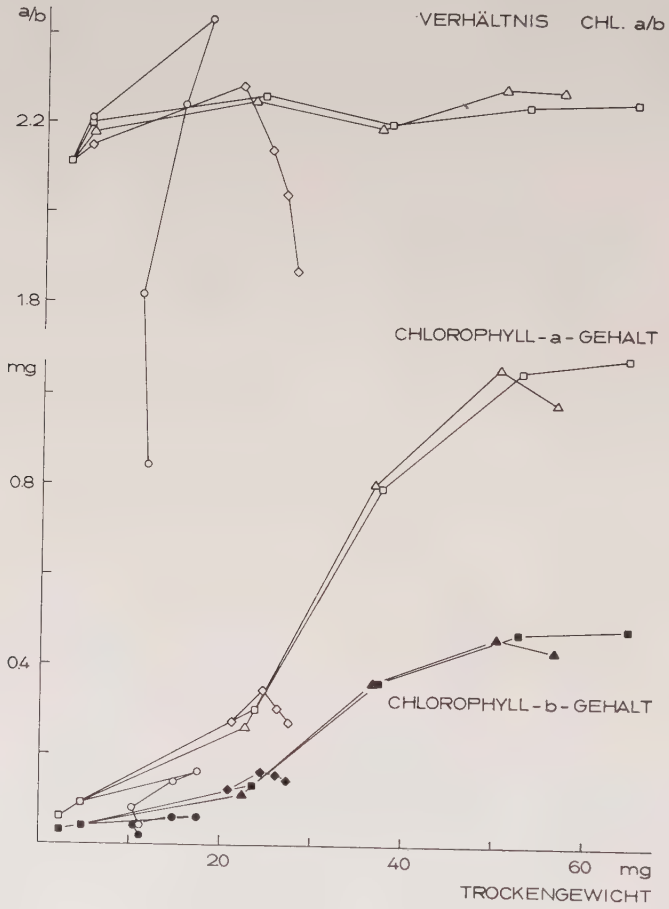
Vorkultur 7 Tage Versuch 10 Tage

Veränderungen des Trockengewichtes (als Mass für das Wachstum) in Funktion der Zeit
Mittelwerte aus 3 Parallelkulturen

□ Kontrolle = 98,5 mg Mg/l
△ Mg_1 = 9,85 mg Mg/l
◇ Mg_2 = 0,985 mg Mg/l
○ Mg_0 = kein Magnesium

Die Zunahme des Chlorophyllgehaltes ist, ausser bei Mg_0, anfänglich in allen Kulturen etwa proportional der Trockengewichtszunahme. Es wird das in der Nährlösung und in den Zellen noch vorhandene Magnesium aufgebraucht, und die Zellen kommen in einen akuten Mangelzustand. Der Zeitpunkt des Beginns dieses Mangels wird in den Kulturen in Abhängigkeit von der vorgegebenen Magnesiumkonzentration früher oder

später erreicht, in den Kulturen Mg_0 nach 4, in den Kulturen Mg_2 nach 6 und in den Kulturen Mg_1 erst nach 8 Tagen. Dann sinkt der Chlorophyllgehalt bis zum Versuchsende, wobei das Trockengewicht in den Kulturen Mg_1 und Mg_2 noch zunimmt. In den Kulturen Mg_0 ist die Chlorophyll-



Figur 12

Autotropher Magnesiummangelversuch mit *Muriella*

Vorkultur 7 Tage Versuch 10 Tage

Veränderungen des Komponentenverhältnisses und des Chlorophyllgehaltes in Funktion des Trockengewichtes (als Mass für das Wachstum)

Mittelwerte aus 3 Parallelkulturen

□ Kontrolle = 98,5 mg Mg/ll
△ Mg_1 = 9,85 mg Mg/
◇ Mg_2 = 0,985 mg Mg/l
○ Mg_0 = kein Magnesium

synthese von Anfang an geringer als die Substanzproduktion. Nach dem Eintritt in den akuten Mangelzustand nehmen Chlorophyllgehalt und Trockengewicht ab.

Im Verlaufe des Versuches werden vor allem die Komponentenverhältnisse der Mangelkulturen Mg_2 und Mg_0 stark beeinflusst, während in den Kulturen Mg_1 gleichartige Schwankungen auftreten wie in der Kontrolle. In der Kultur Mg_0 wird bis zum Eintritt des akuten Mangels, nach 4 Tagen, signifikant mehr Chlorophyll a gebildet als Chlorophyll b, was sich in einer Erhöhung des Verhältnisses Chlorophyll a/b von 2,12 auf 2,43 äussert. In der Kultur Mg_2 ist diese Verschiebung auch zu beobachten, aber nicht im selben Masse (von 2,12 auf 2,28). Nach diesen Maximalwerten sinkt der Koeffizient in beiden Kulturen steil ab und erreicht nach 10 Tagen, am Versuchsende, Minimalwerte von 1,87 (Mg_2) und 1,44 (Mg_0). Diese Endwerte unterscheiden sich signifikant von den Koeffizienten der Kontrollen und der Kulturen Mg_1, und zwar mit einer Signifikanzwahrscheinlichkeit von 0,05 für Mg_2 und 0,01 für Mg_0.

Qualitative Veränderungen in der Pigmentgarnitur wurden keine beobachtet. In den mixotrophen Magnesiummangelversuchen konnten keine signifikanten Komponentenverschiebungen nachgewiesen werden.

Die Resultate der autotrophen Versuche zeigen, dass die Magnesiumkonzentration Mg_1 (= 9,85 mg Mg/l) während der Versuchszeit von 10 Tagen für die Bedürfnisse der Algen ausreicht. Eine kleinere Konzentration ist ungenügend, hemmt das Wachstum, die Substanzproduktion und stört die Chlorophyllsynthese. Aus den Veränderungen des Komponentenverhältnisses muss man schliessen, dass, solange noch Chlorophyll neu gebildet wird, die Synthese von Chlorophyll a stärker ist als jene von Chlorophyll b, dass aber das Chlorophyll a labiler ist und schneller abgebaut wird als Chlorophyll b, sobald der Zelle kein Magnesium mehr zur Verfügung steht.

Diskussion

Schon bei den ersten Vorversuchen zeigte es sich, dass das Komponentenverhältnis Chlorophyll a/b von Kultur zu Kultur schwankt. Es galt daher, die angewandte Aufarbeitungs- und Bestimmungsmethode genau zu prüfen, um sicher zu sein, dass die gefundenen Schwankungen nicht nur durch methodische Fehler verursacht werden. Zudem war es nötig, die gefundenen Resultate anhand statistischer Tests zu prüfen, um sichere Aussagen über Veränderungen des Komponentenverhältnisses unter dem Einfluss von bestimmten äusseren Bedingungen machen zu können.

Aus den gefundenen Resultaten folgt mit Sicherheit, dass durch einen Mangel der Elemente N, Mg und Fe das Konzentrationsverhältnis der beiden Chlorophyllkomponenten verändert wird. Das Chlorophyll a erwies sich in verschiedenen Untersuchungen als das labilere Pigment (Aach, 1954, Egle, 1944, Haspelova, 1963, Hofmann, 1965, Hudock und Levine, 1964, Kandler und Sironval, 1959). Meine Versuche lassen nicht alle den gleichen Schluss zu. Bei Eisen- und Magnesiummangel wird das Komponentenverhältnis eindeutig zugunsten von Chlorophyll b verschoben; Chlorophyll a ist unter diesen Bedingungen labiler. Bei Stickstoffmangel hingegen wird das Verhältnis zugunsten von Chlorophyll a verschoben, danach wäre Chlorophyll b als labiler anzusehen.

Veränderungen im Konzentrationsverhältnis der beiden Chlorophyllkomponenten können durch verschiedene Prozesse verursacht werden:

a) unterschiedliche Bildungsraten für die beiden Komponenten;

b) unterschiedlich starker Abbau, durch Photooxydation oder enzymatische Prozesse;

c) Umwandlung von Chlorophyll a in Chlorophyll b oder umgekehrt.

Welche dieser Prozesse können in meinen Versuchen für die Veränderungen verantwortlich gemacht werden?

Zuerst möchte ich kurz die heute vertretenen Hypothesen über Chlorophyllsynthese und -abbau erwähnen (vgl. Smith und French, 1963).

Ein Syntheseschema für das Chlorophyll a findet sich bei Smith und French. Die Entstehung von Chlorophyll b ist noch ungeklärt. Es werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert, von denen die drei wahrscheinlichsten genannt seien:

a) Umwandlung von Chlorophyll a in Chlorophyll b, nach Sironval und Michel-Wolwertz (1963) auf photooxydativem Wege;

b) Synthese von Chlorophyll a und b von einer gemeinsamen, nahen Vorstufe;

c) Umwandlung einer speziellen Form von Chlorophyll a, einem «jungen Chlorophyll a», in Chlorophyll b.

Experimentell eindeutige Befunde, die eine Entscheidung für eine der vorgeschlagenen Varianten erlauben würden, gibt es noch nicht.

Sironval und Michel-Wolwertz (1963) kommen durch ihre Versuche mit dem Kohlenstoffisotop C^{14} zur Ansicht, dass die Chlorophyllmoleküle nach einer gewissen Zeit durch neue ersetzt werden. Sie finden für Chlorophyll b einen rascheren Umsatz, eine kürzere Lebenszeit als für Chlorophyll a. Arnonoff (1963) arbeitet mit dem Magnesiumisotop

Mg^{28} und findet keinen Einbau in das Chlorophyll von ausgewachsenen Blättern. Er schliesst daraus, dass ein Ersatz der Chlorophyllmoleküle nicht vorkomme. Es ist aber denkbar, dass in den ausgewachsenen Blättern fast immer wieder die gleichen Magnesiumionen in die neuen Moleküle eingebaut werden. Nach längerer Zeit könnte man vielleicht dennoch Isotopen im Chlorophyll finden.

Beim photooxydativen Pigmentabbau wurde beobachtet (Sironval und Kandler, 1958, Kandler und Sironval, 1959), dass *Chlorella* erst ausbleicht, wenn durch die intensive Belichtung der Stoffwechsel geschädigt und dadurch die stabilisierenden Chloroplastenstrukturen teilweise zerstört sind. Beim Ausbleichen verschwindet zuerst Chlorophyll a, dann Chlorophyll b.

Beim *Eisenmangel* wird noch während einer annähernd normalen Chlorophyllsynthese das Komponentenverhältnis zugunsten von Chlorophyll b verschoben (vgl. Figur 5). Dies wäre nach der Auffassung zu erklären, dass das Chlorophyll b durch Umwandlung aus Chlorophyll a entsteht. Die Neusynthese von Chlorophyll a wäre durch den Eisenmangel bereits gehemmt, während eine Umwandlung von Chlorophyll a in b noch normal funktionieren würde. Wird dann, bei extremem Eisenmangel, Chlorophyll abgebaut, sei es durch Photooxydation oder durch enzymatische Prozesse, erweist sich der Chlorophyll-b-Protein-Komplex als stabiler. Eventuell ist sogar noch eine Umwandlung von Chlorophyll a in b möglich und täuscht eine grössere Stabilität von Chlorophyll b vor.

Galling (1963) schliesst aus seinen Versuchen mit *Chlorella*, dass die Hemmung der Chlorophyllsynthese bei *Magnesiummangel* nicht in erster Linie auf dem Fehlen des Zentralatoms des Chlorophyllmoleküls beruhe. Das wird verständlich, wenn man das Syntheseschema (Smith und French, 1963) betrachtet. Danach benötigt das Enzym, das den ersten Schritt zum Aufbau des Porphyrinringsystems, des Grundgerüstes des Chlorophyllmoleküls, katalysiert, bereits Magnesiumionen.

Magnesium ist aber noch für das richtige Funktionieren verschiedener anderer Enzyme nötig. Ein Fehlen wirkt sich daher störend auf den gesamten Stoffwechsel der Zellen aus.

Obwohl in mixotropher Anzucht keine signifikanten Resultate gefunden werden konnten, scheint sich das Komponentenverhältnis wie in den autotrophen Versuchen zu verschieben. Das Auftreten von Bakterien hat die Versuche zu stark beeinträchtigt.

In den autotrophen Versuchen veränderte sich das Komponentenverhältnis anfänglich zugunsten von Chlorophyll a, bei extremem Mangel dann zugunsten von Chlorophyll b (vgl. Fig. 12). Eine Komponentenverschiebung zugunsten von Chlorophyll b ist noch während einer geringen

Zunahme der Chlorophyllkonzentration zu beobachten (Mg_2). Es kann hier, ähnlich wie beim Eisenmangel, eine gestörte Neusynthese von Chlorophyll a und eine einigermassen normale Umwandlung von Chlorophyll a in b angenommen werden. In der Kultur Mg_0 findet man während 6 Tagen einen fast konstanten Chlorophyllgehalt. Es wird vermutet, dass in dieser Zeit ein Teil der Chlorophyllmoleküle ersetzt werden muss (Sironval und Michel-Wolwertz, 1963). Dieser Ersatz ist wiederum durch eine Umwandlung von Chlorophyll a in b zu erklären.

Die Resultate des mixotrophen wie des autotrophen *Stickstoffmangel*-versuches lassen sich mit denjenigen von Aach (1953) vergleichen. Aach hat bei seinen (autotrophen) Mangelkulturen noch eine geringe Nitratkonzentration von 1×10^{-3} m KNO_3 vorgegeben. Dies entspricht ungefähr der Konzentration N_1 mit $1{,}24 \times 10^{-3}$ m KNO_3 in meinen Versuchen. Bei dieser Nitratkonzentration finde ich, wie Aach, in autotropher Kultur anfänglich eine Abnahme, später ein Ansteigen des Koeffizienten. Die Komponentenverschiebung zugunsten von Chlorophyll a setzt aber bedeutend früher ein als bei Aach und ist auch extremer. Im mixotrophen Mangelversuch, bei dem nur eine Analyse gemacht werden konnte, sind die Kulturen N_2 und N_0 als spätere Stadien der Kultur N_1 anzusehen mit bereits vermehrtem Chlorophyll-b-Abbau.

Nach Aach handelt es sich bei diesem Pigmentabbau um eine Lichtwirkung, da bei Dunkelkulturen von Stickstoffmangelzellen keine Pigmentzerstörung beobachtet wurde.

Durch einen Stickstoffmangel werden die die Pigmente stabilisierenden Eiweissstrukturen offenbar sehr rasch zerstört. Es ist vom Beginn des Versuches an ein Pigmentabbau zu beobachten (vgl. Fig. 9). Bei schwächerem Stickstoffmangel (N_1 und N_2 anfänglich) kann wie beim Eisen- und Magnesiummangel ein photooxydativer Abbau der Chlorophylle angenommen werden, wobei ein Teil von Chlorophyll a in Chlorophyll b umgewandelt wird. Dadurch wird das Komponentenverhältnis zugunsten von Chlorophyll b verschoben. Bei extremem Stickstoffmangel (N_0) sind die Strukturen so stark geschädigt, dass eine Umwandlung von Chlorophyll a in Chlorophyll b nicht mehr möglich ist. Das noch vorhandene Chlorophyll b hat nach Sironval und Michel-Wolwertz (1963) eine kürzere Lebensdauer und verschwindet daher schneller als das Chlorophyll a: das Komponentenverhältnis verschiebt sich zugunsten von Chlorophyll a.

Zusammenfassung

1. An Algen wurden das Wachstum (Suspensionsdichte), der Chlorophyllgehalt und vor allem Veränderungen des Komponentenverhältnisses (Chlorophyll a/b) bei Eisen-, Magnesium- und Stickstoffmangel untersucht.

2. Aus der Algensammlung des Botanischen Institutes der Universität Basel wurden Algen ausgewählt, die sich für die Kultur in flüssigen Medien eignen. Es waren dies die Grünalgen *Dictyococcus engadinensis* (Nr. 164) und *Muriella aurantiaca* (Nr. 108). Für die autotrophe Aufzucht grösserer Algenmengen wurde eine spezielle Apparatur gebaut.

3. Die Methode für die quantitative Bestimmung der in den Versuchsorganismen vorhandenen Mengen an Chlorophyll a und b wurde kritisch geprüft.

4. Die Mangelversuche wurden unter mixotrophen (Zugabe von Glukose als zusätzlicher C-Quelle) und autotrophen Bedingungen durchgeführt.

5. Für die untersuchten Grössen bestehen in bezug auf die Art der Beeinflussung keine prinzipiellen Unterschiede zwischen mixotropher und autotropher Aufzucht der Algen.

6. Bei *Eisenmangel* sind das Wachstum und die Chlorophyllbildung verlangsamt. Das Komponentenverhältnis wird zugunsten von Chlorophyll b verändert.

7. Der *Magnesiummangel* setzt die Trockengewichtszunahme (als Mass für das Wachstum) stark herab. Unter extremen Mangelbedingungen wird Chlorophyll abgebaut und das Komponentenverhältnis zugunsten von Chlorophyll b verschoben.

8. Bei *Stickstoffmangel* nimmt bei geringem Wachstum der Chlorophyllgehalt der Zellen sehr rasch ab und sinkt auf Werte, die kleiner sind als bei Eisen- und Magnesiummangel. Das Komponentenverhältnis verändert sich zugunsten von Chlorophyll a.

Die vorliegende Arbeit wurde im *Botanischen Institut der Universität Basel* unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber ausgeführt. Ich danke ihm für sein Interesse an meiner Arbeit und dafür, dass er mir die Mittel des Institutes zur Verfügung gestellt hat.

Ebenso bin ich den Laborantinnen Fräulein R. Gysin und Fräulein E. Rudin sowie dem Laboranten J. Schubert für ihre gelegentliche Mithilfe sehr dankbar. Herr H. Müller half mir beim Bau der Apparaturen, Herr Dr. H. Huber beim Aufstellen der Programme für die Auswertung der Versuche und Herr D. Schweizer hat die in dieser Arbeit verwendete Methode zum Bestimmen von Suspensionsdichten ausgearbeitet. Auch ihnen bin ich zu grossem Dank verpflichtet.

Aach H.G. 1953. Über Abbau und Regeneration der Chloroplastenfarbstoffe bei *Chlorella*. Archiv für Mikrobiologie **19**, 166–173.

— 1954. Über einige Ähnlichkeiten der Lichtwirkung auf grüne Pflanzen und auf das tierische Auge. Z. Naturforschung **9b**, 481–487.

Aronoff S. 1963. Introduction of Mg^{28} into chlorophylls a and b in vivo. Plant Physiol. **38**, 628–631.

Böger P. 1964. Das Strukturproteid aus Chloroplasten einzelliger Grünalgen und seine Beziehung zum Chlorophyll. Flora **154**, 174–211.

Bursche E.-M. 1961. Änderungen im Chlorophyllgehalt und im Zellvolumen bei Planktonalgen, hervorgerufen durch unterschiedliche Lebensbedingungen. Int. Revue ges. Hydrobiol. **46**, 610–652.

Butler W.L. 1964. Absorption spectroscopy in vivo: theory and application. Ann. Rev. Plant Physiol. **15**, 451–470.

Carell E.F. und C.A. Price. 1965. Porphyrins and iron requirement for chlorophyllformation in *Euglena*. Plant Physiol. **40**, 1–7.

Colman B. und W. Vishniac. 1964. Separation of chloroplast pigments on thin layers of sucrose. Biochim. Biophys. Acta **82**, 616–618.

Comar L.P. und F.P. Zscheile. 1942. Analysis of plant extracts for chlorophyll a and b by a photoelectric spectrophotometric method. Plant Physiol. **17**, 198–209.

Dersch G. 1960. Mineralsalzmangel und Sekundärcarotinoide in Grünalgen. Flora **149**, 566–603.

Documenta Geigy. 1960. Wissenschaftliche Tabellen. 6. Auflage. J.R. Geigy AG, Basel.

Egger K. 1962. Dünnschichtchromatographie der Chloroplastenpigmente. Planta **58**, 664–667.

Egle K. 1937. Zur Kenntnis des Lichtfeldes der Pflanze und der Blattfarbstoffe. Planta **26**, 546–583.

Emerson R. 1929. The relation between maximum rate of photosynthesis and concentration of chlorophyll. J. Gen. Physiol. **12**, 609–622.

Finkle B.J. und D. Appleman. 1953 a. The effect of Magnesium concentration on the growth of *Chlorella*. Plant Physiol. **28**, 664–673.

— — 1953 b. The effect of Magnesium concentration on chlorophyll and catalase development in *Chlorella*. Plant Physiol. **28**, 654–663.

Galling G. 1963. Analyse des Magnesiummangels bei synchronen Chlorellen. Archiv für Mikrobiologie **46**, 150–184.

Gris E. 1844. C.R. Acad. Sci., Paris, **19**, 1118–1119.

Hase E., Y. Morimura und H. Tamiya. 1957. Some data on the growth physiology of *Chlorella* studied by the technique of synchronous culture. Arch. Biochem. Biophys. **69**, 149–165.

Haspelova-Horvatovicova A. 1963. Beitrag zur Physiologie letaler Pflanzen von *Zea Mays* mit Chlorophylldefekt IV. Biologia (Bratislava) **18**, 334–347.

Hofmann P. 1965. Chlorophyll variations in Mn-deficient algae. Plant Physiol. **40**, Suppl. xliii.

Hubert R. 1935. The physical state of chlorophyll in living plastid. Rec. Trav. bot. néerl. **32**, 323–390.

Hudock G.A. und R.P. Levine. 1964. Regulation of photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardi*. Plant Physiol. **39**, 889–897.

Jaaska V. 1964. Effect of nitrogen regime on the chemical composition of certain green algae. Izv. Akad. nauk. Est. SSR-Ser. biol. **1**, 33–39. Abstract in Biological Abstracts **46/3**, 12578 (1965).

Kandler O. und C. Sironval. 1959. Photooxydation processes in normal green *Chlorella* cells. 2. Effects on metabolism. Biochim. Biophys. Acta **33**, 207–215.

Karali E.F. und C.A. Price. 1963. Iron, porphyrins and chlorophyll. Nature **198**, 708.

Kol E. und F. Chodat. 1934. Quelques algues nouvelles des sols et de la neige du Parc national, Engadine. Bul. Soc. Bot. Genève, série 2, **25**, 250–263.

Linder A. 1964. Statistische Methoden für Naturwissenschafter, Mediziner und Ingenieure. 4. Auflage. Birkhäuser, Basel.

Marsh H.V., H.J. Evans und G. Matrone. 1963 a. Investigations of the role of iron in chlorophyll metabolism. I. Effect of iron deficiency on the activities of certain enzymes in leaves. Plant Physiol. **38**, 632–638.

— — — 1963 b. II. Effect of iron deficiency on chlorophyll synthesis. Plant Physiol. **38**, 638–642.

Myers J. 1950. Biological accumulation of inorganic materials by algae. Final report to the Office of Naval Research. Laboratory of Algal Physiology. University of Texas.

— und L.B. Clark. 1944. Culture conditions and the development of the photosynthetic mechanism. II. An apparatus for the continuous culture of *Chlorella*. J. Gen. Physiol. **28**, 103–112.

Pirson A., C. Tichy und G. Wilhelmi. 1952. Stoffwechsel und Mineralsalzernährung einzelliger Grünalgen. I. Vergleichende Untersuchungen an Mangelkulturen von *Ankistrodesmus*. Planta **40**, 199–253.

— und S.S.A. Badour. 1960. Kennzeichnung von Mineralsalzmangelzuständen bei Grünalgen mit analytisch-chemischer Methodik. Flora **150**, 234–258.

Price C.A. und E.F. Carell. 1964. Control by iron of chlorophyll formation and growth in *Euglena gracilis*. Plant Physiol. **39**, 862–868.

Rodhe W. 1948. Environmental requirements of fresh-water plankton algae. Symbolae bit. Upsalienses **10**, 1.

Ruschmann G. 1956. Beiträge zur Mikrobiologie der *Chlorella*. Biologisches Zentralblatt **75**, 129–149, 476–499, 576–596.

Schaub H. 1958. Die Milchsäurebildung bei *Rhizopus chinensis* Saito. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **68**, 64–102 (Diss. Basel).

Schweizer D. 1965. Bestimmung des Algengehaltes wässeriger Algensuspensionen mit dem Spektralphotometer Unicam SP 600. Absorptionsspektrum von Chlorophyll in vivo. Bot. Inst. Basel, unveröffentlicht.

Seybold A. 1942. Pflanzenpigmente und Lichtfeld als physiologisches, geographisches und landwirtschaftlich-forstliches Problem. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **60**, 64–85.

— und K. Egle. 1937. Lichtfeld und Blattfarbstoffe I. Planta **26**, 491–515.

— — 1938. Lichtfeld und Blattfarbstoffe II. Planta **28**, 87–123.

Shibata K. 1958. Spectrophotometry of intact biological material. J. of Biochem. **45**, 599–623.

— A.A. Benson und M. Calvin. 1954. The absorption spectra of suspensions of living micro-organisms. Biochim. Biophys. Acta **15**, 461–470.

Sironval C. und O. Kandler. 1958. Photooxydation processes in normal green *Chlorella* cells. 1. The bleaching process. Biochim. Biophys. Acta **29**, 359–368.

— und M.-R. Michel-Wolwertz. 1963. Quelques particularités du métabolisme des chlorophylles. Colloques intern. Ctr. Natl. Rech. Sci. **119**, 317–342.